Iranian Journal of Animal Science
Vol 48, No 3, Autumn 2017 (399-410)
DOI: 10.22059/ijas.2017.243102.653564

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶ (ص ۴۱۰-۳۹۹)

تأثیر پودر دانه‌های رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و زیره (*Carum carvi*) و مخمرها بر فراسنجه‌های تولید گاز، جمعیت تک‌یاختگان و فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبهٔ گوسفند در شرایط آزمایشگاهی

صغرا درخشان‌نیا[۱]، آرش آذرفر[۲*]، ایوب عزیزی[۳] و مهرداد تقی‌زاده[٤]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیهٔ دام، دانشیار و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان
٤. دانشجوی دکتری تغذیهٔ دام، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زابل
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۷/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۹/۱۹)

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر افزودن پودر دانهٔ رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، زیره (*Carum carvi*) و مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* در مقایسه با مونسین بر آزمون تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر، قابلیت هضم مواد مغذی، جمعیت تک‌یاختگان (پروتوزوا) و فعالیت آنزیمی شکمبه بود. هفت جیرهٔ آزمایشی شامل ۱) جیرهٔ شاهد و مکمل کردن جیرهٔ شاهد با ۲) ۸ گرم رازیانه + ۸ گرم زیره (نسبت ۱ به ۱)، ۳) ۱۲ گرم رازیانه + ٤ گرم زیره (به نسبت ۷۵ به ۲۵)، ٤) ۵ گرم مخمر *ساکارومایسس سرویسیه*، ۵) ۵ گرم مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* + ۸ گرم رازیانه و ۸ گرم زیره (نسبت ۱ به ۱)، ٦) ۵ گرم مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* + ۱۲ گرم رازیانه + ٤ گرم زیره (به نسبت ۷۵ به ۲۵) و ۷) ۳۰ میلی‌گرم مونسین در کیلوگرم مادهٔ خشک با استفاده از شیرابهٔ شکمبه در قالب طرح کامل تصادفی نگهداری (انکوبه) شد. بیشترین میزان گاز تولیدی در زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت نگهداری (انکوباسیون)، کل حجم گاز تولیدی، میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، قابلیت هضم ظاهری مادهٔ آلی و برآورد انرژی قابل سوخت‌وساز (متابولیسم) در جیرهٔ مکمل شده با مخمر همراه با پودر رازیانه و زیره (به نسبت ۷۵ به ۲۵) نسبت به جیرهٔ شاهد مشاهده شد ($P<0/05$). بیشترین حجم گاز تولیدی در زمان ۷۲ ساعت نگهداری، قابلیت تولید گاز (b)، فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ کاغذ صافی و آلفا آمیلاز در تیمار مکمل شده با مخمر و نسبت ۱ به ۱ زیره به رازیانه در مقایسه با جیرهٔ مکمل شده با مونسین و جیرهٔ شاهد به دست آمد. بیشترین میزان کل جمعیت پروتوزوا ($P<0/10$) و زیرخانوادهٔ دیپلودینیا ($P\leq0/05$) در تیمار شاهد و کمترین آن در جیرهٔ مکمل شده با رازیانه و زیره (به نسبت ۱ به ۱) همراه با مخمر مشاهده شد. در کل، نتایج این تحقیق نشان داد، پودر رازیانه و زیره همراه با مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* تولید گاز و قابلیت هضم مواد مغذی را از راه تعدیل کردن تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: پودر رازیانه و زیره، تولید گاز، جمعیت پروتوزوا، فعالیت آنزیمی، مخمر.

Effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) and cumin (*Carum carvi*) powder and Saccharomyces cerevisiae in comparison with monensin on *in vitro* gas production parameters, protozoa population and microbial enzyme activity of sheep

Soghra Derakhshan Nia[1], Arash Azarfar[2*], Ayoub Azizi[3] and Mehrdad Taghizadeh[4]
1, 2, 3. M.Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Iran
4. Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran
(Received: Oct. 5, 2017 - Accepted: Dec. 10, 2017)

ABSTRACT

The aim of present research was to investigate effects of supplementation lambs' fattening diet with fennel and cumin powder and Saccharomyces cerevisiae in comparison with monensin on *in vitro* gas production and fermentation parameters, nutrient digestibility, microbial enzyme activity and protozoa population. Seven experimental diets were 1) control diet (basal diet) and supplementing control diet with 2) 8 g fennel (F) + 8 g cumin (C) powder per kg DM (1 to 1 ratio), 3) 12 g F + 4 g C (75 to 25 ratio), 4) 5 g yeast per kg diet DM, 5) 5 g yeast + 8 g F + 8 g C (1 to 1 ratio), 6) 5 g yeast + 12 g F + 4 g C (75 to 25 ratio), and 7) 30 mg monensin per kg diet DM. Diets were incubated in rumen liquor in a completely randomized design. The highest gas production during 24 and 48 h of incubation, total gas production, short chain fatty acids, organic matter digestibility and estimated metabolizable energy were observed in the diet containing yeast along with F and C (75 to 25 ratio) compared to control diet ($P<0.05$). Diet containing yeast along with the same ratio of F and C resulted in the highest gas production during 72 h of incubation, gas production from the insoluble, but fermentable fractions (b), filter paper degrading and α-amylase activities compared to control diet and diet containing monensin ($P<0.05$). The highest total protozoa population ($P<0.10$) and sub-family of *Diplodiniinae* ($P\leq 0.05$) was observed in control diet compared to diet supplemented with yeast along with the 1 to 1 ratio of F and C. In conclusion, we found that cumin and fennel powders along with saccharomyces cerevisiae are promising alternatives to monensin in lambs fattening diets, and that their dietary inclusion improved gas production and nutrients' degradability by modifying rumen fermentation *in vitro*.

Keywords: Enzyme activity, fennel and cumin powder, gas production, protozoan population, yeast.

* Corresponding author E-mail: arash.azarfar@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سال‌هاست که متخصصان تغذیهٔ نشخوارکنندگان به دنبال استفاده از ترکیب‌هایی برای افزایش بازدهی استفاده از انرژی و پروتئین مواد خوراکی هستند. استفاده از ترکیب‌های پادزیستی (آنتی‌بیوتیکی) به دلیل خطر باقی ماندن در محصولات حیوانی و نیز مقاومت پادزیستی میکروب‌ها، همواره مورد پرسش بوده است (Talebzadeh *et al.*, 2012). بنابراین، استفاده از افزودنی‌های غذایی جایگزین مانند زیست‌یار (پروبیوتیک)ها و متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی افزون بر بهبود عملکرد دام، بدون پیامدهای سوء بهداشتی و زیست‌محیطی هستند. زیست‌یار یک ریزجاندار (میکروارگانیسم) یا مخلوطی از چند ریزجاندار است که به مصرف انسان یا دام رسیده، و از راه بهبود ریزگیاهان (میکروفلور) دستگاه گوارش، اثرگذاری‌های سودمندی را به همراه دارد. در بین زیست‌یارهای مختلف می‌توان به مخمرها اشاره کرد. مهم‌ترین مخمر مورد استفاده در جیرهٔ نشخوارکنندگان *ساکارومایسس سرویسیه* است (Adesogan, 2009). کاربرد این مخمر در تغذیهٔ نشخوارکنندگان سبب بهبود عملکرد باکتری‌های هضم‌کنندهٔ لیف (فیبر)ها مانند *فیبروباکتر سوکسینوژنز*، بوتریویبریو فیبروسولونز و گونه‌های رومینوکوکوس شده است و به دلیل فراهم کردن تیامین، که برای رشد و افزونش قارچ‌ها است، سبب تحریک رشد قارچ‌های شکمبه مانند *نئوکالیماستیکس فرونتالیس* می‌شود (Chaucheyras– Durand *et al.*, 2008). لذا استفاده از مخمرها ممکن است به‌طور غیرمستقیم افزایش هضم فیبر در شکمبه و افزایش مصرف خوراک را به دنبال داشته باشد (Chaucheyras– Durand *et al.*, 2008).

متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی مانند ترکیب‌های فنولی، اسانس‌ها و ساپونین‌ها از دیگر مکمل‌هایی هستند که برای افزایش عملکرد دام مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. اسانس‌ها ترکیب‌های فراری هستند که از بسیاری از گیاهان دارویی مانند زیره و رازیانه در فرایند تقطیر با بخار جدا می‌شوند. این ترکیب‌های مسئول تولید عطر و رنگ گیاهان هستند عمدهٔ آن‌ها به علت خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) به‌عنوان افزودنی‌های طبیعی در خوراک استفاده می‌شوند (Greathead, 2003). رازیانه با نام علمی *فونیکولوم ولگار*[1] متعلق به خانوادهٔ چتریان[2] است و یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی در طب قدیم است. مادهٔ مؤثرهٔ رازیانه از نوع اسانس است که بیشترین ترکیب‌های آن را آنتول[3]، فنچون[4] و استراگول[5] تشکیل می‌دهند. زیره گیاهی یک‌ساله و معطر از خانوادهٔ چتریان با نام علمی *کومینوم سیمینوم*[6] است. دانهٔ آن حاوی ۵-۲ درصد اسانس بوده که قسمت اعظم آن را پاراسیمول[7]، آلفا و بتا پنین[8]، کومیک الکل[9]، کومین آلدئید[10]، آلفا و بتا فلاندرن[11]، اوژنول[12]، آلفا ترپینئول[13] و میرسن[14] تشکیل می‌دهد (Haghir Al-sadat *et al.*, 2010). ترکیب‌های موجود در رازیانه و زیره می‌توانند با تأثیر ضد میکروبی همسان مونسین با مهار باکتری‌های گرم مثبت سبب کاهش نسبت تولید استات به پروپیونات شده و سوخت‌وساز (متابولیسم) نیتروژن را در راستای کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی شکمبه و گاز متان تغییر دهند (Hooks *et al.*, 2010). اسانس‌های گیاهی از جمله رازیانه و زیره به دلیل اثر بر دیوارهٔ یاخته‌ای باکتری‌ها، باعث محدودیت رشد بعضی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌شوند. در نتیجه باعث کاهش آمین‌زدایی (دآمیناسیون) و متانوژنز شده و از این راه باعث کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی شکمبه، متان و استات و افزایش اسیدهای چرب پروپیونات و بوتیرات می‌شوند (Castillejos *et al.*, 2006). استفاده از افزودنی‌های گیاهی مانند زیره و رازیانه به همراه مخمرها می‌تواند به‌عنوان یکی از

1. *Foeniculum vulgare*
2. *Umbeliferae*
3. Anethole
4. Fenchone
5. Estragole
6. *Cuminum cyminum*
7. Paracymol
8. Alpha and beta Pinene
9. Cumic alcohol
10. Cumin aldehyde
11. Alpha and beta Phellandrene
12. Eugenol
13. Alpha terpineol
14. Myrcene

Archive of SID

www.SID.ir

راهکارهای موجود برای دست‌کاری محیط (اکوسیستم) میکروبی شکمبه به شمار آید. استفادهٔ توأم زیره و رازیانه به همراه مخمر نیز می‌تواند تأثیر سودمند این ترکیب‌ها را تکمیل کرده و به‌احتمال سبب بهبود عملکرد شکمبه شود. بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی تأثیر دانهٔ رازیانه و زیره به همراه مخمر بر آزمون تولید گاز، تخمیر و فعالیت آنزیمی شکمبه در مقایسه با مونسین با استفاده از مخلوط میکروب‌های شکمبهٔ گوسفند لری بود.

مواد و روش‌ها

دام‌ها، تیمارهای آزمایشی و افزودنی‌های خوراکی مورد آزمون

آزمایش‌ها با استفاده از ۲ رأس گوسفند نر نژاد لری مجهز به فیستولای شکمبه‌ای با میانگین وزن ۵±۵۵ کیلوگرم به‌عنوان دهندهٔ مایع شکمبه صورت گرفت. بررسی‌های آزمایشگاهی روی یک جیرهٔ فرضی بره پرواری به‌عنوان جیرهٔ پایه (جدول ۱) که بر پایهٔ جدول‌های نیازهای غذایی NRC (2007) تنظیم شده بود صورت گرفت و آنگاه با افزودنی‌های خوراکی مختلف شامل پودر دانهٔ رازیانه، زیره، مخمر یا مونسین مکمل شد. از هفت جیرهٔ آزمایشی برای نگهداری (انکوباسیون) آزمایشگاهی شامل ۱) جیرهٔ شاهد (بدون هرگونه افزودنی خوراکی؛ جدول ۱)، و مکمل کردن جیرهٔ شاهد با ۲) ۸ گرم رازیانه + ۸ گرم زیره (نسبت ۱ به ۱) در کیلوگرم مادهٔ خشک، ۳) ۱۲ گرم رازیانه + ۴ گرم زیره (به نسبت ۷۵ به ۲۵)، ۴) ۵ گرم مخمر *ساکارومایسس سرویسیه*، ۵) ۵ گرم مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* + ۸ گرم رازیانه و ۸ گرم زیره (نسبت ۱ به ۱)، ۶) ۵ گرم مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* + ۱۲ گرم رازیانه + ۴ گرم زیره (به نسبت ۷۵ به ۲۵) و ۷) ۳۰ میلی‌گرم مونسین در کیلوگرم مادهٔ خشک جیره بود.

میزان افزودن پودر دانهٔ رازیانه و زیره به تیمارهای آزمایشی بنابر نتایج تحقیقات صورت گرفته (Khiaosa-ard & Zebeli, 2014) انجام شد و برابر ۱۶ گرم در هر کیلوگرم مادهٔ خشک (تأمین‌کنندهٔ ۰/۵ گرم اسانس و تعیین‌شده با استفاده از دستگاه کلونجر) به ازای هر کیلوگرم مادهٔ خشک مصرفی بود. سطح بهینهٔ مخمر و مونسین (به‌عنوان کنترل مثبت) مورد نیاز برای افزودن به جیره‌ها بر پایهٔ آزمون غربالگری آزمایشگاهی به ترتیب ۵ و ۳۰ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک تعیین شد (Taghizadeh, 2017).

جدول ۱. اقلام و ترکیب شیمیایی جیرهٔ برهٔ پرواری نگهداری‌شده در شرایط آزمایشگاهی (درصد مادهٔ خشک)

Table 1. Diet ingredients and chemical composition of fattening lamb incubated *in vitro* (% of dry matter)

Items	% of diet
Alfalfa hay (dried)	30
Barley grain, ground	25
Corn grain, ground	20
Wheat bran	12
Soybean meal	8.0
Vitamin-mineral premix[1]	2.5
Dicalcium phosphate	2.0
Salt	0.50
Chemical composition	
Dry matter (fresh weight)	93.5
Organic matter	92.5
Crude protein	14.3
Neutral Detergent Fiber (NDF)	25.3
Acid Detergent Fiber (ADF)	18.7
Calcium	0.20
Metabolizable energy (MJ/kg DM)	2.21

۱. ۱ کیلوگرم مکمل مواد کانی-ویتامینی حاوی ۹۹/۲ میلی‌گرم منگنز، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۸۴/۷ میلی‌گرم روی، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۰/۲ میلی-گرم سلنیوم، ۹۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D و ۱۸ واحد بین‌المللی ویتامین E بود (رشد دانه، کرج، ایران).

1. Contained (per kg): 99.2 mg Mn, 50 mg Fe, 84.7 mg Zn, 1 mg Cu, 1 mg I, 0.2 mg Se2, 9000 IU vitamin A, 2000 IU vitamin D and 18 IU vitamin E (Roshd-Daneh, Karaj, Iran).

آزمون تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر

برای انجام آزمون تولید گاز توسط مخلوط میکروبی شکمبه، شیرابهٔ شکمبه از دو رأس گوسفند فیستولاگذاری شده که به مدت دو هفته با جیرهٔ غذایی حاوی ۶۰ درصد علوفه و ۴۰ درصد کنسانتره عادت‌دهی شده بودند، پیش از خوراک‌دهی وعدهٔ صبح توسط پمپ خلأ گردآوری شد. شیرابهٔ شکمبه بی‌درنگ توسط چهار لایه پارچهٔ پنیر صاف شد و در دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس به‌سرعت به آزمایشگاه انتقال داده شد. دو دورهٔ آزمون تولید گاز به‌طور همزمان انجام شد. در دورهٔ اول، در آغاز میزان ۲۵۰ میلی‌گرم نمونه خوراک آسیاب شده با اندازهٔ ذرات ۱ میلی‌متر به درون هر لولهٔ آزمایشگاه (ویال) برای تعیین فراسنجه‌های آزمون تولید گاز قرار داده شد (پنج تکرار به ازای هر تیمار). آنگاه، هر لوله که از

Archive of SID

www.SID.ir

پیش دمای آن با قرار دادن در بن‌ماری به ۳۹ درج، سلسیوس رسیده بود، با ۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه و ۲۵ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی تلقیح شد (Marten & Barnes, 1980). برای به‌دست‌آمده اطمینان از شرایط بی‌هوازی، گاز دی‌اکسید کربن به شیرابهٔ شکمبه صاف و همچنین بزاق مصنوعی پیش از تزریق به درون لوله‌ها نیز تزریق شد. سه لوله نیز به‌عنوان شاهد یا بلانک (حاوی تنها مایع شکمبه و بزاق مصنوعی) در نظر گرفته شد. سپس درپوش لوله‌ها گذاشته و بسته شد و در بن‌ماری با دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. میزان گاز تولیدی در لوله‌ها توسط دستگاه فشارسنج در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از نگهداری اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فراسنجه‌های تولید گاز، چهار لوله به ازای هر تیمار در نظر گرفته شد و آزمایش در سه دوره (ران) صورت گرفت. برای تعیین فراسنجه‌های تولید گاز از رابطهٔ ($P = b(1 - e^{-ct})$) استفاده شد (Ørskov & McDonald, 1979). در رابطهٔ یادشده b گاز تولیدی از بخش تخمیرپذیر (میلی‌لیتر)، c نرخ تولید گاز در ساعت، t زمان نگهداری برحسب ساعت و P میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر است.

دورهٔ دوم آزمون تولید گاز نیز با ۴ لوله به ازای هر تیمار در سه دوره، به‌منظور تعیین قابلیت هضم شکمبه‌ای مادهٔ خشک، pH، نیتروژن آمونیاکی، ساخت (سنتز) پروتئین میکروبی، شمارش تک‌یاختگان (پروتوزوا) و فعالیت آنزیمی شکمبه طراحی شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری، در آغاز میزان گاز تولیدی هر لوله ثبت شد. پس از آن درپوش لوله‌ها باز شد و pH آن‌ها به‌وسیلهٔ دستگاه pH متر (مدل 744؛ شرکت Metrohm سوئیس) اندازه‌گیری شد. محتوای هر لوله با ۲۰۰۰g به مدت بیست دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شد. بقایای هر لوله گردآوری و خشک شد. میزان قابلیت هضم شکمبه‌ای مادهٔ خشک از اختلاف وزن بسترهٔ (سوبسترای) اولیه و وزن بقایا پس از نگهداری محاسبه شد. برای تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی، نمونه‌های مواد معلق و رسوبی یا سوپرناتانت (۵ میلی‌لیتر) به‌سرعت با ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. میزان قابلیت هضم شکمبه‌ای مادهٔ آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز به ترتیب بر پایهٔ معادله‌های زیر برآورد شد (Menke & Steingass, 1988):

$$IVOMD\ (g/kg\ OM) = 148.8 + 8.89\ GAS + 4.50\ CP + 6.51\ XA$$

$$ME\ (MJ/kg\ DM) = 2.20 + 0.136\ GAS + 0.057\ CP + 0.0029\ CP^2$$

که در این رابطه‌ها IVOMDمیزان قابلیت هضم مادهٔ آلی؛ ME انرژی قابل سوخت‌وساز؛ CP میزان پروتئین خام به‌صورت گرم در ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک؛ XA خاکستر به‌صورت گرم در ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک و GAS میزان گاز خالص تولیدی برای ۲۰۰ میلی‌گرم بستره پس از ۴۸ ساعت نگهداری است.

تولید پروتئین میکروبی (MPS) به‌صورت زیر محاسبه شد (Blümmel *et al.*, 1997):

$$MPS\ (mg/g\ DM) = mg\ TDS - (ml\ gas \times 2.2\ mg/ml)$$

که در آن TDS بسترهٔ هضم‌شدهٔ حقیقی و ۲/۲ عامل استوکیومتری برحسب میلی‌گرم کربن، هیدروژن و اکسیژن مورد نیاز برای ساخت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر است.

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از رابطهٔ Getachew *et al.* (2002) به‌صورت زیر محاسبه شد:

$$SCFA\ (mmol/200\ mg\ DM) = 0.0222GP - 0.0042$$

که در این رابطهٔ SCFA اسیدهای چرب فرار تولیدی و GP حجم گاز تولیدی در زمان ۴۸ ساعت نگهداری است.

فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیهٔ کاغذ صافی و آلفا آمیلاز موجود در بخش میکروبی چسبیده به ذرات خوراکی (پلت‌های گردآوری‌شده) بر پایهٔ روش Agarwal (2000) برآورد شد. آنزیم‌های مترشحه از میکروب‌های شکمبه در سه بخش مختلف شکمبه شامل برون یاخته‌ای، درون‌یاخته‌ای و آنزیم‌های مربوط به میکروب‌های چسبیده به ذرات خوراکی هستند. در بررسی‌های

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایشگاهی به دلیل اینکه مایع شکمبه با بافر رقیق می‌شود، به‌طورمعمول تعیین فعالیت آنزیمی در بخش‌های برون و درون یاخته‌ای به دلیل غلظت کم آنزیم انجام نمی‌شود و بیشتر تعیین فعالیت آنزیمی میکروب‌های چسبیده به ذرات خوراکی مدنظر است.

قابلیت هضم دو مرحله‌ای مواد مغذی

قابلیت هضم برون‌تنی مواد مغذی جیره‌های آزمایشی حاوی مواد افزودنی مختلف به روش هضم دو مرحله‌ای Tilly & Terry (1963) صورت گرفت. در این آزمایش برای هر تیمار میزان هشت تکرار در نظر گرفته شد. نمونه‌های خوراکی در آزمایشگاه به مدت ۴۸ ساعت در معرض محیط کشت مایع شکمبه- بزاق مصنوعی (به نسبت ۱ به ۴) قرار گرفتند و پس از آن، به مدت ۴۸ ساعت دیگر توسط محلول اسید کلریدریک- پپسین نگهداری شدند (Tilley & Terry, 1963). در نهایت، قابلیت هضم مادهٔ خشک، مادهٔ آلی، لیف نامحلول در شویندهٔ خنثی و لیف نامحلول در شویندهٔ اسیدی تعیین شد.

تجزیهٔ شیمیایی نمونه‌ها

میزان مادهٔ خشک نمونه‌ها در آون با دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت تعیین شد (AOAC, 1990). میزان خاکستر خام در کورهٔ الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجهٔ سلسیوس تعیین شد و میزان مادهٔ آلی از اختلاف بین وزن مادهٔ خشک نمونهٔ اولیه با وزن خاکستر محاسبه شد (AOAC, 1990). میزان ADF و NDFبه ترتیب بر پایهٔ روش‌های AOAC (1990) و Van Soest *et al.* (1991) شد. میزان نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه با استفاده از معرف‌های فنول و هیپوکلریت و به روش Broderick & Kang (1980) اندازه‌گیری شد. شمارش میکروسکوپی تک‌یاختگان و زیرجنس‌های آن در مخلوط میکروبی شکمبه به روشDehority (2004) صورت گرفت.

تجزیهٔ آماری

تجزیهٔ واریانس داده‌های مربوط به تولید گاز و قابلیت هضم نمونه‌ها، با استفاده از رویهٔ مختلط و توسط نرم‌افزارSAS (2001) با استفاده از مدل آماری زیر صورت گرفت:

$$Y_{ijk}= \mu + T_i + R_j + e_{ijk}$$

در این مدل Y_{ijk}، μ، T_i، R_j و e_{ijk} به ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر تیمار آزمایشی iام، اثر دوره آزمایش jام و اثر خطای آزمایشی بود. مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت سطح معنی‌داری ۵ درصد و تمایل به معنی‌داری ۱۰ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

تولید گاز

همان‌طوری که در جدول ۲ نشان داده شده است، بیشترین میزان گاز تولیدی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نگهداری و کل حجم گاز تولیدی در جیرهٔ مکمل شده با مخمر همراه با پودر رازیانه و زیره (به نسبت ۷۵ به ۲۵) و کمترین میزان آن‌ها در تیمار شاهد مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بیشترین و کمترین میزان گاز تولیدی در زمان ۷۲ ساعت و قابلیت تولید گاز (ضریب b) به ترتیب در تیمار مکمل شده با مخمر و نسبت ۱ به ۱ زیره به رازیانه و تیمار شاهد به دست آمد. این در حالی است که میزان تولید گاز بین جیره‌های آزمایشی مختلف معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). در این بررسی با نگهداری توسط مخلوط میکروبی شکمبه اثر مثبت ترکیب رازیانه و زیره همراه با مخمر بر مؤلفه‌های تولید گاز نشان داده شد، که به‌احتمال به دلیل وجود آنتول و پاراسیمول در گیاه زیره و رازیانه بوده است (Haghir Al-sadat *et al.*, 2010). همچنین، نقش مثبت مخمر بر تولید گاز احتمال دارد به دلیل اثر هم‌کنش افزایی آن با ترکیب‌های مؤثره رازیانه و زیره بوده، زیرا نشان داده شده است که استفاده از مخمر در جیرهٔ نشخوارکنندگان سبب افزایش جمعیت میکروبی شکمبه، به‌ویژه باکتری‌های سلولولایتیک می‌شود (Chaucheyras– Durand *et al.*, 2008). بنابر این نتایج، تغییرات قابل توجه گاز تولیدی پس از ۷۲ ساعت نگهداری برون‌تنی با افزودن سطوح مختلف روغن نارگیل و پودر سیر نیز مشاهده شد (Kongmun *et al.*, 2010). در بررسی دیگری توسط Patra *et al.*

Archive of SID

www.SID.ir

(2006) با استفاده از عصارهٔ سه نوع مختلف گیاه دارویی نیز کل تولید گاز افزایش یافت، که دلیل آن محتوای قند محلول موجود در عصارهٔ گیاهان یادشده عنوان شد. مغایر با یافته‌های این آزمایش، در بررسی Jahani Azizabadi (2014)، پس از ۲۴ ساعت نگهداری جیرهٔ حاوی ۲۰ درصد علوفه و ۸۰ درصد مواد متراکم، که با ۱۹ نوع اسانس گیاهی مکمل شده بود، اسانس‌های گشنیز، ریحان و اکلیل کوهی حجم گاز تولیدی را کاهش دادند.

فراسنجه‌های تخمیر

بنابر نتایج جدول ۳، افزودن مخمر همراه با پودر دانهٔ رازیانه و زیره (به ترتیب به نسبت ۷۵ به ۲۵) به جیرهٔ آزمایشی میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، قابلیت هضم ظاهری مادهٔ آلی و برآورد انرژی قابل سوخت‌وساز را نسبت به تیمار شاهد و تیمار حاوی مونسین افزایش داد (P<۰/۰۵). قابلیت هضم شکمبه‌ای مادهٔ خشک و ساخت پروتئین میکروبی تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵).

جدول ۲. تأثیر افزودنی‌های جیره‌ای مختلف بر فراسنجه‌های تولید گاز جیره‌های آزمایشی توسط مخلوط ریزجانداران شکمبه گوسفند

Table 2. Effect of different feed additives on *in vitro* gas production parameters of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of sheep

Treatments	*In vitro* gas production parameters					
	GP_{24}[1]	GP_{48}[2]	GP_{72}[3]	TGP[4]	b[5]	c[6]
Control diet	40.1^{e}	49.2 ^{e}	51.9^{c}	54.6^{c}	53.4^{c}	0.057
Control + fennel (F) and cumin (C) (75 to 25 ratio)	47.2^{bc}	56.1^{bcd}	62.8^{ab}	64.7^{ab}	64.1^{a}	0.060
Control + F and C (1 to 1 ratio)	47.4^{bc}	58.4^{ab}	63.5^{a}	66.6^{a}	65.4^{a}	0.038
Control + yeast + F and C (75 to 25 ratio)	51.2^{a}	60.2^{a}	62.4^{ab}	67.0^{a}	65.1^{a}	0.071
Control + yeast + F and C (1 to 1 ratio)	47.9^{b}	57.3^{bc}	63.7^{a}	66.7^{a}	67.3^{a}	0.064
Control + yeast (5 g/kg dry matter)	45.0^{cd}	54.9^{cd}	60.1^{ab}	63.4^{ab}	62.4^{ab}	0.051
Control + monensin (30 mg/kg dry matter)	44.7^{d}	53.4^{d}	57.5^{b}	60.4^{b}	58.4^{b}	0.064
SEM[7]	0.78	0.94	1.66	1.36	1.42	0.007
P-value[8]	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.12

۱. حجم گاز تولیدی پس از ۲۴ ساعت نگهداری (میلی‌لیتر)، ۲. حجم گاز تولیدی پس از ۴۸ ساعت نگهداری (میلی‌لیتر)، ۳. حجم گاز تولیدی پس از ۷۲ ساعت نگهداری (میلی‌لیتر)، ۴. کل حجم گاز تولیدی پس از ۹۶ ساعت نگهداری (میلی‌لیتر)، ۵. قابلیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر)، ۶. میزان تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، ۷. خطای استاندارد میانگین‌ها، ۸. احتمال معنی‌داری، حروف غیر همسان در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است (P < ۰/۰۵).

1. *In vitro* gas production for 24 h (ml); 2. *In vitro* gas production for 48 h (ml); 3. *In vitro* gas production for 72 h (ml); 4. Total gas production for 96 h (ml); 5. Gas production from the insoluble but fermentable fractions for 96 h (ml); 6. Rate constant of gas production during incubation (/h); 7. Standard error of the means; 7. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

جدول ۳. تأثیر افزودنی‌های جیره‌ای مختلف بر فراسنجه‌های تخمیر جیره‌های آزمایشگاهی توسط مخلوط ریزجانداران شکمبهٔ گوسفند

Table 3. Effect of different feed additives on fermentation parameters of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of sheep

Treatments	Fermentation parameters						
	SCFA[1]	IVDMD[2]	IVOMD[3]	ME[4]	pH	NH_3-N[5]	MPS[6]
Control diet	0.87^{e}	71.0	61.0^{d}	8.41^{e}	6.26^{a}	283^{a}	359
Control + fennel (F) and cumin (C) (75 to 25 ratio)	0.99^{bcd}	75.5	67.1^{ab}	9.16^{bcd}	6.17^{c}	136^{bc}	386
Control + F and C (1 to 1 ratio)	1.03^{ab}	73.8	68.53^{a}	9.41^{ab}	6.27^{a}	141^{bc}	347
Control + yeast + F and C (75 to 25)	1.06^{a}	75.2	69.0^{a}	9.61^{a}	6.19^{bc}	77^{c}	328
Control + yeast + F and C (1 to 1 ratio)	1.01^{bc}	70.9	67.2^{ab}	9.29^{bc}	6.24^{ab}	153^{bc}	312
Control + yeast (5 g/kg dry matter)	0.97^{cd}	73.6	65.4^{bc}	9.02^{cd}	6.22^{abc}	203^{ab}	355
Control + monensin (30 mg/kg dry matter)	0.94^{d}	74.4	63.5^{c}	8.87^{d}	6.27^{a}	194^{b}	350
SEM[7]	0.016	1.74	0.76	0.102	0.018	24.76	15.47
P-value[8]	< 0.01	0.43	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.01	0.15

۱. اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، ۲. ناپدید شدن مادهٔ خشک (درصد)، ۳. ناپدید شدن مادهٔ آلی (درصد)، ۴. برآورد انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاژول در کیلوگرم مادهٔ خشک)، ۵. نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)، ۶. ساخت پروتئین میکروبی (میلی‌گرم در هر گرم مادهٔ خشک)، ۷. خطای استاندارد میانگین‌ها، ۸. احتمال معنی‌داری، حروف غیر همسان در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است (P < ۰/۰۵).

1. Short chain fatty acids (Mg/ml dry matter); 2. Dry matter disappearance (%); 3. Organic matter disappearance (%); 4. Estimated metabolisable energy (MJ/kg dry matter); 5. Ammonia nitrogen (mg/l); 6. Microbial protein synthesis (mg/g dry matter); 7. Standard error of means; 8. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

Archive of SID

www.SID.ir

بیشترین میزان pH در جیرهٔ شاهد و جیرهٔ مکمل شده با مونسین و کمترین میزان آن در جیرهٔ حاوی پودر رازیانه و زیره (به نسبت ۷۵ به ۲۵) مشاهده شد (P<۰/۰۵). همهٔ افزودنی‌های جیره‌ای به استثنای جیرهٔ حاوی مخمر به تنهایی سبب کاهش معنی‌دار غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به تیمار شاهد شدند و جیرهٔ حاوی پودر رازیانه و زیره (به نسبت ۷۵ به ۲۵) همراه با مخمر کمترین میزان غلظت نیتروژن آمونیاکی را به خود اختصاص داد (P<۰/۰۵). Talebzadeh *et al.* (2012) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، با افزودن سطوح ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰، ۶۰۰ میکروگرم اسانس آویشن شیرازی در میلی‌لیتر محیط کشت حاوی مایع شکمبه، تنها در غلظت بالای ۴۵۰ میکروگرم قابلیت هضم واقعی مادهٔ آلی کاهش یافت. این محققان وجود ترکیب‌های فنولیک در این گیاهان را دلیل اصلی کاهش قابلیت هضم عنوان کردند. به‌هرحال، در این تحقیق دلیل بهبود گوارش‌پذیری با افزودن پودر رازیانه و زیره به‌احتمال اثر هم‌کنش افزایی مخمر مورد استفاده با آن‌ها بوده است.

بنابر نتایج این تحقیق، Hussain & Cheeke (1995) گزارش کردند، عصارهٔ یوکا می‌تواند باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه و پلاسما و نیز نیتروژن اوره‌ای پلاسما شود. اسانس‌های گیاهی می‌توانند با مهار فعالیت باکتری‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک بالا، از طریق کاهش آمین‌زدایی اسیدهای آمینه میزان نیتروژن آمونیاکی شکمبه را کاهش دهند (Patra *et al.*, 2006). نتایج تحقیقات دیگر نیز نشان داده است، اسانس‌ها با کاهش جمعیت باکتری‌ها و تک‌یاخته‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک شکمبه به میزان فراوان سبب کاهش نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه می‌شوند (Wallace, 2004). تولید آمونیاک در شکمبه به دلیل فعالیت باکتری‌های پروتئین‌شکن (پروتئولیتیک) و باکتری‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک بالا[1] است (McIntosh *et al.*, 2003). کمتر از ۰/۰۱ جمعیت باکتریایی شکمبه را باکتری‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک بالا تشکیل می‌دهند، اما آن‌ها فعالیت آمین‌زدایی شدیدی دارند (Russell *et al.*, 1988). حضور ترکیب‌های ثانویه زیره و رازیانه در محیط تخمیر احتمال دارد از راه کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز (Hussain & Cheeke, 1995)، یا به‌واسطهٔ کاهش باکتری‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک بالا (McIntosh *et al.*, 2003) سبب کاهش نیتروژن آمونیاکی شده باشد. هرچند نشان داده شده است، تأثیر اسانس‌ها و ترکیب‌های فعال آن‌ها بر میزان آمونیاک شکمبه به جیرهٔ پایه و pH محیط کشت بستگی دارد (Cardozo *et al.*, 2005). نتایج همسانی مبنی بر کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه با استفاده از اسانس نعناع و اکالیپتوس گزارش شده است (Agarwal *et al.*, 2009; Mirzaei *et al.*, 2014). هرچند Yang *et al.* (2007) در نتایج بررسی‌های خود نشان دادند که افزودن روغن سیر یا مونسین به جیرهٔ گاوهای شیرده تأثیر معنی‌داری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه ندارد.

کمترین میزان pH شکمبه در جیرهٔ مکمل شده با مخلوط رازیانه و زیره (به نسبت ۷۵ به ۲۵ به دست آمد، درحالی‌که بیشترین میزان گاز تولیدی در جیرهٔ مکمل شده با رازیانه و زیره (به نسبت یکسان) همراه با مخمر مشاهده شد که احتمال دارد به دلایلی غیر از گاز تولیدی مربوط باشد.

قابلیت هضم دو مرحله‌ای مواد مغذی

قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک، مادهٔ آلی، الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی (NDF) و الیاف نامحلول در شویندهٔ اسیدی (ADF) تحت تأثیر مخلوط ریزجانداران شکمبه قرار نگرفت (جدول ۴؛ P>۰/۰۵).

بنا بر این نتایج، در بررسی افزودن اسانس آویشن به جیرهٔ غذایی گوسفندان تغذیه‌شده با جیرهٔ حاوی ۲۰ درصد علوفه و ۸۰ درصد کنسانتره (۱/۳ میلی‌لیتر به ازای هر رأس در روز) تأثیری بر قابلیت هضم مواد مغذی نداشت (Jahani Azizabadi, 2014). در نتایج برخی بررسی‌ها تأثیر مثبت اسانس‌های گیاهی بر قابلیت هضم مواد مغذی در کل دستگاه گوارش گزارش شده است (Klevenhusen *et al.*, 2011)، اما

1. Hyper Producing Ammonia (HPA)

Archive of SID

www.SID.ir

برخی دیگر گویای تأثیر نداشتن آن‌ها بوده است (Santos *et al.*, 2010). نتایج تحقیقات مختلف (Benchar *et al.*, 2007; Cardozo *et al.*, 2005) نشان می‌دهد، تأثیر اسانس‌های گیاهی بر قابلیت هضم جیره احتمال دارد وابسته به سطح اسانس و نوع جیرهٔ مصرفی است. اختلاف‌های موجود میان نتایج این بررسی و بررسی‌های دیگر ممکن است مربوط به تفاوت در دُز مصرفی و ترکیب شیمیایی اسانس مورد استفاده، ترکیب جیرهٔ پایه و شرایط انجام آزمایش (درون‌تنی یا آزمایشگاهی) و یا طول دورهٔ آزمایش باشد.

فعالیت آنزیمی

تأثیر افزودنی‌های جیره‌ای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده در محیط آبکی یا هیدرولیتیک (واحد در دقیقه در میلی‌لیتر مایع شکمبه) مخلوط ریزجانداران شکمبهٔ گوسفند در جدول ۵ ارائه شده است. فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ کاغذ صافی تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بین جیره‌های مختلف نشان داد و در تیمار حاوی مخمر همراه با پودر دانهٔ رازیانه و زیره (نسبت ۱ به ۱) به‌طور معنی‌داری بالاتر از دیگر تیمارهای آزمایشی بود ($P<۰/۰۵$). بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیمی آلفا-آمیلاز به ترتیب در تیمار حاوی پودر رازیانه و زیره (به نسبت ۱ به ۱) و تیمار شاهد مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). فعالیت دیگر آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ لیف‌ها شامل کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز (آویسلاز) تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت ($P>۰/۰۵$).

جدول ۴. تأثیر افزودنی‌های جیره‌ای مختلف بر قابلیت هضم دو مرحله‌ای آزمایشگاهی مواد مغذی جیره‌های آزمایشی توسط مخلوط ریزجانداران شکمبهٔ گوسفند

Table 4. Effect of different feed additives on two-stage nutrient digestibility of experimental diets using ruminal microorganisms of sheep

Treatments	Nutrient digestibility			
	DM[1]	OM[2]	NDF[3]	ADF[4]
Control diet	79.2	78.7	51.7	47.1
Control + fennel (F) and cumin (C) (75 to 25 ratio)	80.0	78.6	54.5	46.0
Control + F and C (1 to 1 ratio)	81	78.8	50.2	47.1
Control + yeast + F and C (75 to 25 ratio)	84.4	79.6	54.5	49.7
Control + yeast + F and C (1 to 1 ratio)	88.2	79.0	54.9	48.7
Control + yeast (5 g/kg dry matter)	82.7	78.8	50.2	48.1
Control + monensin (30 mg/kg dry matter)	77.5	78.6	52.1	43.3
SEM[5]	4.09	1.04	8.84	10.3
P-value[6]	0.50	0.15	0.96	0.91

۱. مادهٔ خشک، ۲. مادهٔ آلی، ۳. الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی، ۴. الیاف نامحلول در شویندهٔ اسیدی، ۵. خطای استاندارد میانگین‌ها، ۶. احتمال معنی‌داری، حرف‌های غیر همسان در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است ($P < ۰/۰۵$).

1. Dry matter; 2. Organic matter; 3. Neutral detergent fibre; 4. Acid detergent fibre; 5. Standard error of means; 6. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

جدول ۵. تأثیر افزودنی‌های جیره‌ای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده در محیط آبکی (واحد در دقیقه در میلی‌لیتر مایع شکمبه) جیره‌های آزمایشی توسط مخلوط ریزجانداران شکمبهٔ گوسفند

Table 5. Effect of different feed additives on the activity of hydrolytic enzymes (units per minute in ml of ruminal fluid) of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of sheep

Treatments	CMCase[1]	MCCase[2]	FPD[3] activity	Alpha amylase
Control diet	2.13	4.363	0.733^{bc}	5.48^{b}
Control + fennel (F) and cumin (C) (75 to 25 ratio)	1.90	4.033	0.813^{abc}	7.69^{ab}
Control + F and C (1 to 1 ratio)	2.22	4.363	1.052^{a}	10.33^{a}
Control + yeast + F and C (75 to 25 ratio)	1.46	4.178	0.806^{abc}	8.59^{a}
Control + yeast + F and C (1 to 1 ratio)	2.05	5.0	0.944^{ab}	9.94^{a}
Control + yeast (5 g/kg dry matter)	1.53	4.085	0.891^{ab}	8.96^{a}
Control + monensin (30 mg/kg dry matter)	1.79	4.411	0.635^{c}	8.96^{a}
SEM[4]	0.23	0.25	0.075	0.79
P-value[5]	0.2	0.2	0.03	0.01

۱. کربوکسی متیل سلولاز، ۲. میکروکریستالین سلولاز، ۳. فعالیت تجزیه کاغذ صافی، ۴. خطای استاندارد میانگین‌ها، ۵. احتمال معنی‌داری، حرف‌های غیر همسان در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است ($P<۰/۰۵$).

1. Carboxymethyl cellulose; 2. Microcrystalline cellulase; 3. Filter paper-degrading activity; 4. Standard error of means; 5. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت آنزیم‌های میکروبی انعکاس کیفی از میکروب‌های دخیل در هضم خوراک بوده و این مجموعهٔ میکروبی شکمبهٔ شامل آنزیم‌هایی است که به‌صورت همکوش عمل می‌کنند (Russel, 2002). به‌منظور بررسی فعالیت میکروبی شکمبه، تعیین وضعیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده در محیط آبکی در این محیط یکی از فراسنجه‌های با اهمیت به شمار می‌رود، زیرا این آنزیم‌ها نشان‌دهندهٔ میزان حضور میکروب‌های تجزیه‌کنندهٔ الیاف هستند (Silva *et al.*, 1987). تجزیهٔ مؤثر خوراک در شکمبه نیازمند وجود مجموعهٔ کاملی از آنزیم‌های مختلف است و این امر اهمیت شناخت فعالیت آنزیمی در شکمبه دام را نشان می‌دهد (Selinger *et al.*, 1996). در این بررسی افزایش فعالیت تجزیهٔ کاغذ صافی در جیرهٔ مکمل‌شده با مخمر و مخلوط رازیانه و زیره (به نسبت ۱ به ۱) بنا بر نتایج به دست آمده درزمینهٔ کل گاز تولیدی (جدول ۲) در تیمار یادشده است که نشان‌دهندهٔ تخمیر مطلوب میکروبی است. در تحقیقات مختلفی تأثیر ضد پروتئین‌شکن اسانس‌های گیاهی در شکمبه نشان داده شده است (Patra *et al.*, 2006; Newbold *et al.*, 2004). در این بررسی با اینکه فعالیت پروتئاز شکمبه تعیین نشد، اما افزایش فعالیت آلفا آمیلاز شکمبه‌ای در تیمار حاوی رازیانه و زیره (به نسبت ۱ به ۱) همراه با مخمر، احتمال دارد باعث کاهش رشد میکروب‌های پروتئین‌شکن و افزایش رقابت میکروب‌های تجزیه‌کنندهٔ آمیلو (آمیلولیتیک) برای رشد و تافزونش شده باشد.

فعالیت آنزیمی شکمبه شامل آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ بسپار (پلیمر)های دیوارهٔ یاخته‌ای (سلولازها، زایلانازها، بتاگلوکانازها، پکتینازها)، آمیلازها، پروتئازها، فیتازها و آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ سموم گیاهی است (Selinger *et al.*, 1996). با مورد آزمون قرار دادن فعالیت آنزیمی در بخش‌های مختلف شیرابهٔ شکمبه گاومیش مورا[1] اذعان کردند که حدود ۹۲-۸۰، ۱۵-۸ و ۴-۱درصد کل فعالیت آنزیمی شکمبه به ترتیب در بخش جامد، درون یاخته‌ای و برون یاخته‌ای مشاهده شد (Agarwal *et al.*, 2000). هرچند، در این بررسی فعالیت آنزیمی تنها در بخش جامد مایع شکمبه اندازه‌گیری شد. مشخص شده است که شمار بیشتر میکروب‌های وابسته به بخش جامد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک که به‌طور عمده در تجزیهٔ مواد لیفی دخیل هستند می‌شوند (Raghuvansi *et al.*, 2007; Cheng & McAllister, 1997).

جمعیت تک‌یاختگان

تأثیر افزودنی‌های جیره‌ای مختلف بر جمعیت تک‌یاختگان (جدول ۶) نشان می‌دهد که افزودنی‌های جیره‌ای سبب کاهش کل جمعیت تک‌یاختگان شدند، و بیشترین و کمترین میزان جمعیت تک‌یاختگان به ترتیب در تیمار جیرهٔ شاهد و تیمار جیرهٔ مکمل شده با رازیانه و زیره (به نسبت ۱ به ۱) همراه با مخمر بود (P=۰/۰۸).

از زیر خانواده‌های تک‌یاختگان، جمعیت دیپلودینیا نیز تحت تأثیر تیمارهای آزمایش قرار گرفت و بیشترین و کمترین میزان آن به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار حاوی رازیانه و زیره همراه با مخمر مشاهده شد (P≤۰/۰۵). جمعیت دیگر زیر خانواده‌های تک‌یاختگان شامل انتودینینه، افریواسکلوسینه، ایزوتریشیا و داسیتریشیا تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). بنابر نتایج این تحقیق، خاصیت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی علیه دامنهٔ گسترده‌ای از ریزجانداران از جمله تک‌یاختگانی شکمبه به اثبات رسیده است (Benchaar *et al.*, 2003). از آنجایی که مادهٔ مؤثرهٔ رازیانه از نوع اسانسی است که بیشترین ترکیب‌های آن را آنتول، فنچون و استراگول تشکیل می‌دهند و دانهٔ زیره نیز حاوی ۵-۲ درصد اسانسی است که قسمت اعظم ترکیب‌های مؤثر آن از پاراسیمول، آلفا و بتا پنین، کومیک الکل، کومین آلدئید، آلفا و بتافلاندرن، یوژنول، آلفاترپینئول و میرسن تشکیل می‌شود (Hagher Al-Sadat *et al.*, 2010)، به‌احتمال این ترکیب‌ها از طریق ایجاد پیوند با استرول غشای یاخته‌ای تک‌یاختگان سبب تغییر نفوذپذیری یاخته شده که در نهایت باعث تجزیهٔ یاخته‌ای تک‌یاختگان شده است (Benchaar *et al.*, 2008). نتایج همسانی نیز توسط Agarwal *et al.* (2009) گزارش شده است. گرچه برخلاف نتایج این تحقیق، استفاده از ترکیبی از چند اسانس گیاهی در برخی از پژوهش‌ها (Newbold *et al.*, 2004; McIntosh *et al.*, 2003) تأثیر کاهشی بر جمعیت تک‌یاختگان نداشته است.

1. Murrah

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶. تأثیر افزودنی‌های جیره‌ای مختلف بر جمعیت تک‌یاختگان (ml/ ۵×۱۰)

Table 6. Effects of different feed additives on protozoan population (×10^5/ml)

Treatments	Protozoa population					
	Total	*Isotricha*	*Dasytricha*	*Entodiniinae*	*Diplodiniinae*	*Ophrioscolecinae*
Control diet	2.4^{a}	0.53	0.58	1.68	0.82^{a}	0.96
Control + fennel (F) and cumin (C) (75 to 25 ratio)	1.68^{ab}	0.34	0.38	1.34	0.58^{b}	0.67
Control + F and C (1 to 1 ratio)	1.82^{ab}	0.34	0.38	1.4	0.58^{b}	0.72
Control + yeast + F and C (75 to 25 ratio)	1.44^{ab}	0.38	0.34	1.06	0.43^{b}	0.53
Control + yeast + F and C (1 to 1 ratio)	1.2^{b}	0.24	0.38	0.96	0.43^{b}	0.58
Control + yeast (5 g/kg dry matter)	1.92^{ab}	0.34	0.48	1.49	0.67^{b}	0.82
Control + monensin (30 mg/kg dry matter)	2.06^{a}	0.38	0.48	1.54	0.72^{a}	0.91
SEM[1]	1.48	0.97	1.16	1.81	0.87	1.13
P-value[2]	0.08	0.86	0.11	0.47	0.05	0.28

۱. خطای استاندارد میانگین‌ها، ۲- احتمال معنی‌داری، حرف‌های غیر همسان در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است ($P < ۰/۰۵$).

1. Standard error of means; 2. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد، مکمل کردن جیرهٔ برهٔ پرواری (حاوی نسبت ۳۰ به ۷۰ علوفه به کنسانتره) با پودر زیره و رازیانه (به نسبت ۱ به ۱ یا ۷۵ به ۲۵) همراه با مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* در شرایط آزمایشگاهی جایگزین مناسبی برای مونسین است، که با تعدیل کردن شرایط تخمیر شکمبه‌ای سبب افزایش تولید گاز و تجزیه‌پذیری مواد مغذی شد. به‌هرحال انجام بررسی‌های بیشتر به‌ویژه روی دام‌های پرواری برای تأیید نتایج این تحقیق ضرورت دارد.

REFERENCES

1. Agarwal, N., Agarwal, I., Kamra, D. N. & Chaudhary, L. C. (2000). Diurnal variations in the activities of hydrolytic enzymes in different fractions of rumen contents of Murrah buffalo. *Journal of Applied Animal Research*, 18, 73-80.
2. Agarwal, N., Shekar, C., Kumar, R., Chaudhary, L. C. & Kamra, D. N. (2009). Effect of peppermint (*Menthapiperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology*, 148, 321-327.
3. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. *Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.*
4. Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Ouellet, D. R. & Chiquette, J. (2003). Effects of essential oil supplement on ruminal fermentation, rumen microbial populations and *in Sacco* degradation of dry matter and nitrogen in the rumen of lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 83, 637. (Abstr)
5. Benchaar, C. (2008). Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livestock Science*, 117, 215-224.
6. Blümmel, M., Steingss, H. & Becker, K. (1997). The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and ^{15}N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. Br*itish Journal of Nutrition*, 77, 911-921.
7. Broderick, G. & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, 63, 64-75.
8. Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2005). Screening for effects of natural extracts at different pH on *in vitro* rumen fermentation of high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Sci*ence, 83, 2572-2579.
9. Castillejos, L. Calsamiglia, S. & Ferret, A. (2006). Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *Journal Dairy Science*, 89(7), 2649-58.
10. Chaucheyras-Durand, F., Walker, N. D. & Bach, A. (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 5-26.
11. Cheng, K. J. & McAllister, T. A. (1997). *Compartmentation in the rumen. In The rumen microbial ecosystem* (eds PN Hobson and CS Stewart), pp. 492-522. Chapman and Hall, London.
12. Dehority, B. A. (2004). *In vitro* determination of generation times for *Entodinium exiguum*, *Ophryoscolex purkynjei* and *Eudiplodinium maggii*. *Journal Eukaryote Microbial*, 51, 333-338.
13. Jahani Azizabadi, H. (2014). *The effect of some natural essential oils on digestive microbial actions and production of rumen methane-in vitro and in vitro.* Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (in Farsi)

Archive of SID

www.SID.ir

14. Getachew, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *Journal of Agricultural Science*, 139, 341-352.
15. Greathead, H. (2003). Plant and plants extracts for improving animal prodactivity. *Journal of proceeding of the Nutrition society*, 62, 279-290.
16. Hagher Al-Sadat, B., Bernard, F., Sheriff, S. & Sheikh, M. (2010). Effect of effective compounds and antioxidant properties of essential oil of Yazd black yeast. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 18, 326-338. (in Farsi)
17. Hooks, S. E., Wright, A. D. & McBride, B. W. (2010). Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*, 20, 1-11.
18. Hussain, I. & Cheeke, P. R. (1995). Effect of *Yucca Scidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate or roughage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 51, 231-242.
19. Khiaosa-ard, R. & Zebeli, Q. (2014). Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *Journal of Animal Science*, 91-1819-1830.
20. Klevenhusen, F. Zeitz, J. O., Duval, S., Kreuzer, M. & Soliv, C. R. (2011). Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 356-363.
21. Kongmun, P., Wanapat, M., Pakdee, P. & Navanukraw, C. (2010). Effect of coconut oil and garlic powder on *in vitro* fermentation using gas production technique. *Livestock Science*, 127, 38-44.
22. Marten, G. C. & Barnes, R. F. (1980). Prediction of energy digestibility of forages with *in vitro* rumen fermentation and fungal enzymes systems. P 61-71. In Pidgen, W.J., C.C. Balch, and M. Graham, (ed.) *Standardization of Analytical Methodology for Feeds*. International Development Research Center, Ottawa.
23. McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A. & Newbold, C. J. (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiol*ogy, 69, 5011-5014.
24. Menke, K. H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
25. Mirzaei, S., Moeini, M. M., Hozhabri, F. & Nooriyan Soroor, M. E. (2014). *The in vitro effects of three medicinal plants on ruminal fermentation parameters and methane reduction*. MSc Thesis. Faculty of Agriculture, Razi University, Iran. (in Farsi)
26. National Research Council. (2007). *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervide, and New World Camelids*. National Academy of Sciences, Washington DC, USA, p. 362.
27. Newbold, C. J., McIntosh, F. M., Williams, P., Riccardo, L. & Wallace, R. J. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 114, 105-112.
28. Patra, A. K., Kamra, D. N. & Agarwal, N. (2006). Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 276-291.
29. Ørskov, E. R. & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, 92, 499-503.
30. Raghuvansi, S. K. S., Prasad, R., Tripathi, M. K., Mishra, A. S., Chaturvedi, O. H., Misra, A. K., Saraswat, B. L. & Jakhmola, R. C. (2007). Effect of complete feed blocks or grazing and supplementation of lambs on performance, nutrient utilisation, and rumen fermentation and rumen microbial enzymes. *Animal*, 1, 221-226.
31. Russell, J. B., Strobel, H. J. & Chen, G. (1988). Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Applied Environmental Microbiology*, 54, 872-877.
32. Russel, J. B. (2002). *Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition*. J.B. Russell Publication Co., Ithaca, NY.
33. Santos, M. B., Robinson, P. H., Williams, P. & Losa, R. (2010). Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. *Animal Feed Science and Technology*, 157, 64-71.
34. SAS. (2001). User's Guide. Version 9. SAS Institute, Cary, NC.
35. Selinger, L. B., Forsberg, C. W. & Cheng, K. J. (1996). The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*, 2, 263-284.
36. Silva, A. T., Wallace, R. J. & Orskov, E. R. (1987). Use of particle-bound microbial activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. *British Journal of Nutrition*, 57, 407-415.

Archive of SID

www.SID.ir

37. Taghizadeh, M. (2017). *The effect of powdered fennel, cumin and yeast on yield, carcass characteristics, blood metabolites and rumen ecosystems of fattening lambs fed with high concentrate rations*. Ph.D. thesis. Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran. (in Farsi)
38. Talebzadeh, R., Alipour, D., Saharkhiz, M. J., Azarfar, A. & Malecky, M. (2012). Effect of essential oils of *Zataria multiflora* on *in vitro* rumen fermentation, protozoal population, growth and enzyme activity of anaerobic fungus isolated from Mehraban sheep. *Aninal Feed Science and Technology*, 172, 115-124.
39. Tilly, J. M. A. & Terry, R. A. (1963). A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*, 18, 104-111.
40. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.
41. Wallace, R. J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 621-629.
42. Yang, W. Z., Benchaar, C., Ametaj, B. N., Chaves, A. V., He, M. L. & McAllister, T. A. (2007). Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *Journal of Dairy Sci*ence, 90, 5671-5681.

Archive of SID

www.SID.ir